

异基因造血干细胞移植联合内皮祖细胞输注对骨髓炎性损伤的影响

黎雯 李明峰 赵苹苹 乔建林 徐开林 曾令宇

【摘要】 目的 探索异基因造血干细胞移植联合内皮祖细胞(EPC)输注对骨髓炎性损伤的影响。方法 6~8周龄BALB/c(H-2K^d)小鼠经致死剂量全身照射(TBI)预处理后建立异基因骨髓移植模型(BMT组),并在BMT基础上同时输注体外培养的EPC,建立骨髓联合EPC移植模型(EPC组)。移植后第7、14、21、28天分别获取各组小鼠骨髓细胞,流式细胞术检测EPC培养比率及两组嵌合率变化,通过骨髓细胞和外周血细胞计数比较两组骨髓造血情况,Western blot法检测骨髓巨噬细胞表面特异性标志CD68表达水平;实时定量PCR及Western blot法分析骨髓炎性复合体nlrp1、nlrp6、caspase-1 mRNA及蛋白表达水平。结果 移植后第7天BMT组嵌合率为(83.69±1.26)%,明显低于EPC组的(91.65±2.77)%($P<0.05$)。在移植后第10、15、20天,EPC组小鼠外周血中的WBC、网织红细胞、PLT均高于BMT组(P 值均 <0.05),在第7、21天EPC组骨髓中原始红细胞较BMT组高(P 值均 <0.05)。HE染色显示,移植后第7、14、21天,EPC组骨髓微环境恢复较BMT组快。Western blot检测显示EPC组骨髓CD68蛋白表达水平较BMT组低。EPC组nlrp1、nlrp6、caspase-1 mRNA及蛋白表达水平在移植后各时间点接近正常表达水平,与BMT组相比,差异均有统计学意义(P 值均 <0.05)。结论 异基因造血干细胞移植联合输注EPC可减少炎性细胞的浸润及减少炎性复合体的活化,促进骨髓造血重建。

【关键词】 炎性复合体; 造血干细胞移植; 内皮祖细胞

基金项目:国家自然科学基金(81370602、81400082);江苏省自然科学基金(BK20140219);中国博士后科学基金(2015 M570479);江苏省杰出教授项目

Effects of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in combination with infusion of endothelial progenitor cells on bone marrow inflammatory injury Li Wen, Li Mingfeng, Zhao Pingping, Qiao Jianlin, Xu Kailin, Zeng Lingyu. Blood Diseases Institute, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, China

Corresponding author: Zeng Lingyu, Email: zengly2000@163.com.

【Abstract】 Objective To explore effects of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in combination with infusion of endothelial progenitor cells (EPC) on bone marrow inflammatory injury. **Methods** 6–8 weeks BALB/c (H-2K^d) mice after lethal dose of irradiation (TBI) were subjected to allogeneic bone marrow transplantation (BMT group) or co-transplantation of EPC (EPC group). Samples of bone marrow cells of mice in each group on days 7, 14, 21, 28 after transplantation were obtained to detect EPC cultural and cell chimeric rates by flow cytometer. Mice were sacrificed on days 7, 14, 21 and 28 post HSCT to analyze bone marrow pathology by H&E staining, the infiltration of macrophages and neutrophils by Western blot, validation expression levels of inflammatory complexes nlrp1, nlrp6 and its downstream molecules caspase-1 by Q-PCR and Western blot. **Results** Cell chimeric rate on day 7 after transplantation in EPC group [(91.65±2.77)%] was significantly higher than in BMT group [(83.69±1.26)%]. Alleviated osteomyelitis injury and inflammatory cell infiltration in EPC group were observed when compared with BMT mice. Also significant reductions of the levels of nlrp1, nlrp6, caspase-1 transcription complexes in EPC mice were noted when compared with BMT ones. **Conclusion** Co-transplantation of HSC and EPC could alleviate inflammatory cell infiltration and activation of the complex to pro-

mote the repair of bone marrow.

【Key words】 Inflammatory complex; Hematopoietic stem cell transplantation; Endothelial progenitor cells

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81370602, 81400082); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20140219); China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (2015M570479); the Funding for the Distinguished Professorship Program of Jiangsu Province

造血干细胞移植(HSCT)是治疗恶性血液病的有效途径之一^[1]。骨髓微环境是造血重建的重要场所,然而移植预处理在清除肿瘤细胞的同时,不仅直接破坏了骨髓微环境的结构,也引起强烈的炎症反应,加重微环境损伤^[1-4]。为此,促进骨髓微环境修复是改善造血重建的重要途径^[5]。

血管龛是骨髓微环境的重要组成部分,是造血干细胞出入的门户及分化的场所^[6-7],其由单层内皮细胞构成,在移植预处理中受到严重破坏^[8-9]。Salter等^[10]及我们研究团队在前期研究中发现,HSCT联合输注内皮祖细胞(EPC),EPC分化为内皮细胞修复损伤内皮,从而促进造血重建^[11-12]。而这种修复是否也可改善骨髓腔中的炎症反应?目前尚未见报道。炎症复合体途径是介导单核、巨噬细胞等炎症细胞发挥途径的重要途径^[13-17]。为此,本研究我们从骨髓腔中损伤内皮入手,采用HSCT联合输注EPC,探索损伤内皮修复对骨髓微环境炎症反应的影响,进一步解析EPC促进造血重建的机制。

材料与方法

1. 实验动物:清洁级雄性BALB/c(H-2k^d)小鼠,10~12周龄,体重22~25 g;清洁级C57BL/6(H-2K^b)雄性小鼠,10~12周龄,体重22~25 g,均购于上海斯莱克实验动物有限公司。于徐州医科大学实验动物中心恒温恒湿屏障系统内饲养,给予自由采食灭菌颗粒饲料,饮用无菌水。

2. 主要试剂与器材:抗鼠CD45-PerCP Cy5.5、CD144-APC、CD31-FITC、CD133-PE抗体购于美国BD公司。EGM-2培养基购于瑞士Lonza公司,DMEM培养基、胎牛血清购于美国Gibco公司,人纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)、胰蛋白酶、总RNA提取试剂TRIzol、M-MLV反转录酶、DEPC、氯仿、异丙醇购于美国Invitrogen公司,荧光定量PCR试剂盒购于德国Roche公司,琼脂糖粉购于宝生物工程(大连)有限公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天生物技术研究所,流式细胞仪(FACSCalibur)购于美国BD公司,荧光定量PCR仪购于美国ABI公

司,UVP图像分析仪购于美国UVP公司,生物分子成像仪(ImageQuant LAS4000)购于美国GE公司。

3. EPC培养与鉴定:取C57BL/6雄性小鼠骨髓细胞,EGM-2培养基调整骨髓细胞密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$;然后接种在包被有 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ FN的培养瓶中; 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、湿度95%条件下培养。48 h全量换液。每日于倒置显微镜下观察细胞形态。取培养第6天细胞,用于输注。取培养第7天细胞,采用流式细胞术和激光共聚焦法鉴定EPC细胞。

4. 骨髓细胞制备:取C57BL/6雄性小鼠颈椎脱臼处死,碘伏浸泡5~7 min,无菌快速分离股骨、胫骨,剪去骨髓端用PBS冲出骨髓腔内细胞,200目滤网过滤,PBS洗涤($335 \times g$ 离心5 min)2遍,PBS重悬,计数,备用。

5. 骨髓移植及实验分组:清洁级BALB/c雄性小鼠移植前4 h单次给予⁶⁰Co γ 射线全身照射,总剂量7.5 Gy,剂量率0.68 Gy/min;实验分为3组:①致死量照射预处理组(TBI组):TBI后尾静脉注射PBS 0.25 ml,共5只小鼠,用于观察骨髓是否成功,移植小鼠在14 d内全部死亡,说明骨髓成功;②骨髓移植组(BMT组),TBI后尾静脉注射骨髓单个核细胞 $5 \times 10^6/\text{只}$,共24只小鼠;③EPC输注联合骨髓移植组(EPC组),TBI后尾静脉注射骨髓单个核细胞 $5 \times 10^6/\text{只}$,输注EPC $5 \times 10^5/\text{只}$,共24只小鼠。移植后第7、14、21、28天分别获取各组小鼠骨髓细胞,流式细胞术检测两组嵌合率变化,通过骨髓细胞和外周血细胞计数比较两组骨髓造血情况,Western blot法检测骨髓巨噬细胞表面特异性标志CD68蛋白表达水平。同时取小鼠股骨HE染色,行组织病理学观察。

6. 实时荧光定量PCR及Western blot分析骨髓细胞nlrp1、nlrp6、caspase-1 mRNA及蛋白表达水平:分别提取小鼠移植后第7、14、21、28天骨髓细胞总RNA,反转录后通过实时荧光定量PCR法检测其nlrp1、nlrp6、caspase-1 mRNA水平,实验步骤按试剂盒说明书进行,以 β -actin mRNA作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA的相对表达量。同时提取总蛋白,采用Western blot法检测其蛋白表达水平。实验步骤

按本实验室常规方法进行。

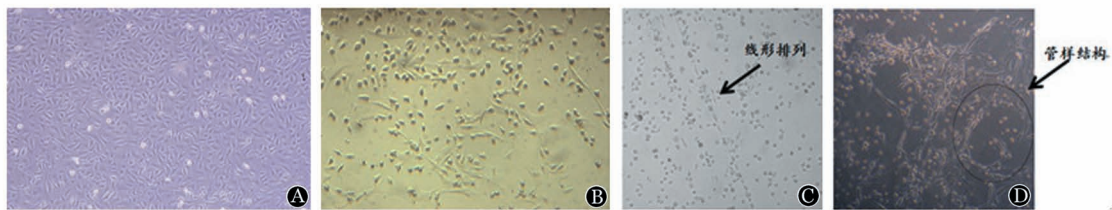
7. 统计学处理:定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据分析用 SPSS 16.0 统计软件进行处理;两组间比较若方差齐采用 *t* 检验,若方差不齐,采用非参数检验;多组间比较采用单因素方差分析。实时定量 PCR 检测的相对表达量采用重复测量方差分析。 $P\leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. EPC 培养与鉴定:取 C57BL/6 小鼠刚分离的骨髓细胞,于 EGM-2 培养基中倒置显微镜下观察, EPC 呈圆形,细胞形态小;活细胞比率>95%,24 h 后可见细胞开始贴壁;3~5 d 后出现纺锤形细胞,并有微小集落形成,周围的细胞以集落为中心(图 1A);培养至第 7 天时,形成中央主要为圆形细胞,周围为梭形细胞的集落,部分细胞出现趋于血管样结构的生长(图 1B)。培养至第 10 天时,可观察到数条由

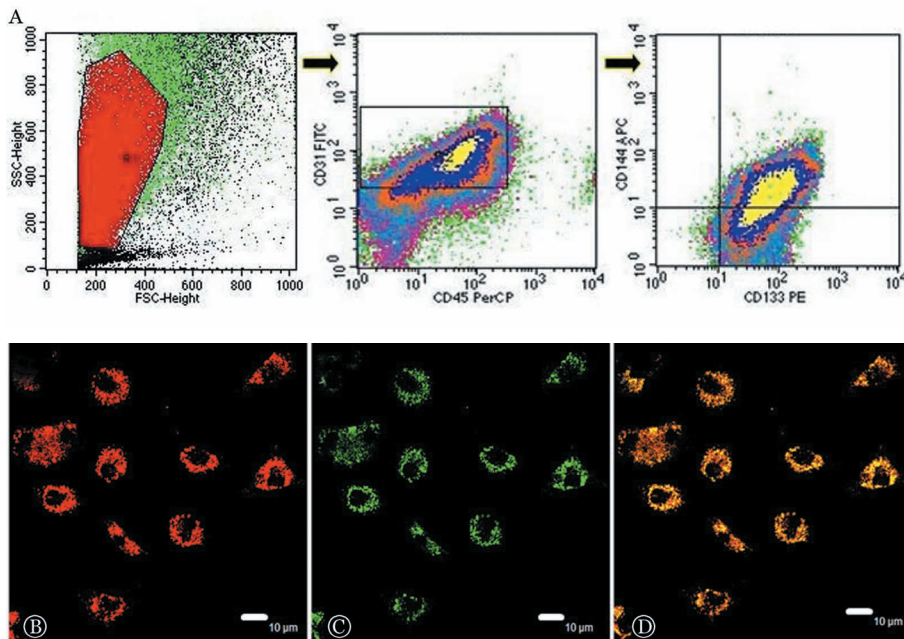
梭形贴壁首尾连接形成的条索状结构,成线性排列(图 1C);培养至第 15 天时,相邻的细胞簇之间相互连接形成血管网样结构(图 1D)。取培养第 7 天的细胞,流式细胞术分析表明,CD45^{low}CD31⁺CD144⁺CD133⁺细胞占 63.27%,表明经 7 d 培养,培养体系中 EPC 细胞比例为 63.27%(图 2A)。细胞培养至第 7 天,激光共聚焦显微镜下可以看到红色 DiI-Ac-LDL(图 2B),绿色 FITC-UEA-1(图 2C),双荧光阳性细胞被认为是 EPC(图 2D)。

2. EPC 联合输注对移植后骨髓嵌合的影响:比较两组移植后第 7、14、28 天骨髓嵌合率变化,结果显示,移植后第 7 天 BMT 组较 EPC 组嵌合率低($P< 0.05$)。至第 14 天两组差异不明显,均达较高水平;第 28 天,两组骨髓已基本达到完全嵌合(表 1)。故单纯 BMT 组和联合输注 EPC 移植模型均成功建立,且从结果可以看出,联合 EPC 输注对骨髓的嵌合具有促进作用。



A~D 分别为体外培养第 5、7、10、15 天

图 1 体外培养内皮祖细胞形态($\times 100$)



A: 流式细胞术检测 CD45^{low} CD31⁺CD133⁺CD144⁺细胞群比例 63.27%; B、C、D 分别为激光共聚焦显微镜下示 EPC 用 DiI-Ac-LDL 染色呈现红色荧光、用 FITC-UEA-1 染色呈现绿色荧光、两个均表达呈现黄色

图 2 内皮祖细胞(EPC)的鉴定

表1 移植后单纯骨髓移植组(BMT组)和联合输注内皮祖细胞组(EPC组)嵌合率变化($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	嵌合率		
	第7天	第14天	第28天
BMT组	83.69±1.26	97.79±3.34	99.99±0.01
EPC组	91.65±2.77	99.97±0.01	100.00±0.01
<i>t</i> 值	4.531	1.130	1.225
<i>P</i> 值	0.0116	0.322	0.288

3. EPC联合输注对造血重建的影响:移植后第7、14、21、28天,取小鼠骨髓细胞计数。结果显示,EPC组骨髓细胞数在第7、14天较BMT组高($P<0.05$),骨髓中原始红细胞在第14、21天较BMT组低($P<0.05$)(表2)。移植后取外周血进行细胞计数,EPC组WBC在第10、15、20、30天较BMT组高(P 值均 <0.05)(图3A);外周血网织红细胞在第5、10、15、20天较BMT组高(P 值均 <0.05)(图3B);PLT在第15、20、30天较BMT组高(P 值均 <0.05)(图3C)。骨髓中原始红细胞与外周血网织红细胞的变化趋势相反,可能原始红细胞产生后迅速动员至外周血,参与造血重建。上述结果提示,EPC可以促进骨髓造血。

4. EPC联合输注对骨髓微环境修复的影响:移植后第7、14、21、28天取小鼠股骨,HE染色后行组织病理学观察。结果显示,BMT组小鼠第7天骨髓几乎腾空,而EPC组造血组织及骨髓间质开始增多;第14天,EPC组小鼠骨髓造血组织及间质明显

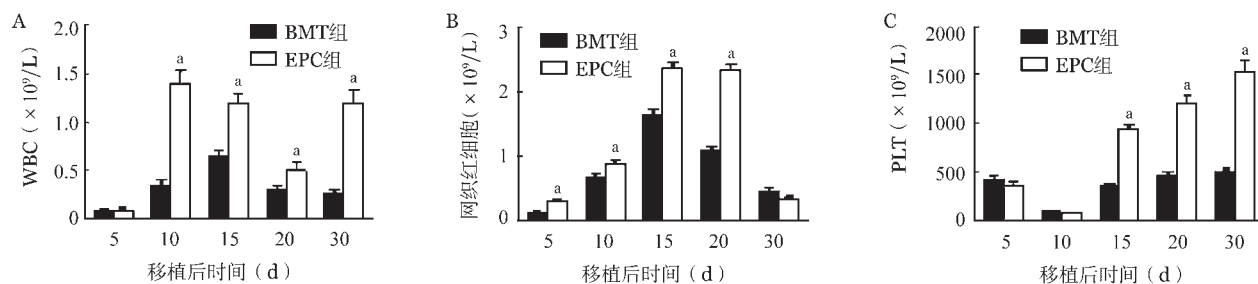
多于BMT,BMT组有出血现象及细胞坏死;第21天,两组骨髓中有核细胞数量和造血组织较第14天有所减少,并且BMT组骨髓出血及脂肪细胞增生严重,EPC组也有少量出血及脂肪细胞增生现象;第28天两组骨髓中造血组织的量未见明显差异,且与21天相比均变化较小。提示EPC于移植后前期促进了造血微环境的修复,减少细胞的损伤。

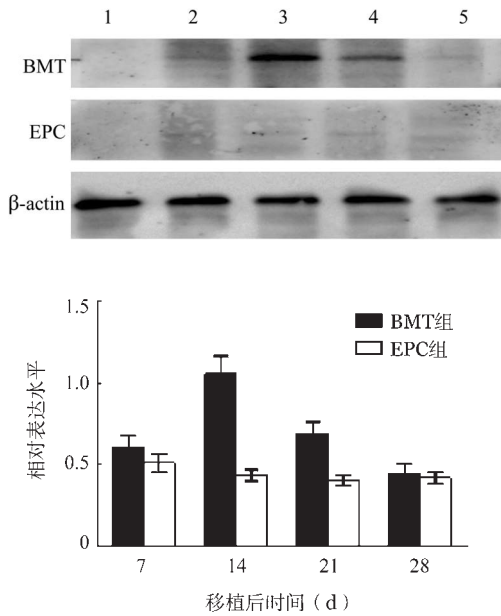
5. EPC联合输注对CD68蛋白表达的影响:移植后第7、14、21、28天取小鼠骨髓细胞,提取总蛋白后,用Western blot法检测其巨噬细胞表面特异性标志CD68在骨髓中的表达水平,以此了解巨噬细胞在小鼠骨髓中浸润程度的变化。结果提示EPC组CD68蛋白在第7、14和21天均有少量表达,但远低于BMT组各时间表达水平(图4)。

6. EPC联合输注对nlrp1、nlrp6、caspase-1表达的影响:分别取移植后第7、14、21、28天小鼠骨髓细胞进行实时定量PCR及Western blot检测。实时定量PCR结果显示EPC组nlrp1转录水平在移植后各时间点接近正常表达水平,与BMT组相比,各时间点差异均有统计学意义,其中以第14天表达水平差异最大(BMT组为 250.29 ± 18.50 ,EPC组为 3.77 ± 0.22 , $P<0.05$)(图5A)。nlrp1蛋白水平变化趋势与mRNA水平的变化一致(图6A)。nlrp6转录水平两组比较,第14、21天差异有统计学意义($P<0.05$),其他时间点两组间差异无统计学意义($P>0.05$)(图5B)。nlrp6蛋白水平变化趋势与mRNA水平的变化一致(图6B)。EPC组caspase-1转录水平在第7

表2 移植后单纯骨髓移植组(BMT组)和联合输注内皮祖细胞组(EPC组)骨髓细胞及骨髓原始红细胞的变化($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	骨髓细胞($\times 10^7/\text{ml}$)				骨髓原始红细胞(%)			
	第7天	第14天	第21天	第28天	第7天	第14天	第21天	第28天
BMT组	0.25±0.03	2.88±0.11	3.84±0.33	3.04±0.16	1.77±0.010	1.45±0.21	2.32±0.03	3.58±0.11
EPC组	1.00±0.01	3.62±0.20	3.82±0.42	3.00±0.22	1.55±0.05	1.05±0.18	2.01±0.08	3.45±0.16
<i>t</i> 值	4.046	3.992	0.1079	0.2158	2.163	3.933	3.048	1.278
<i>P</i> 值	0.004	0.004	1.000	0.999	0.090	0.005	0.023	0.219

**图3** 移植后单纯骨髓移植组(BMT组)和联合输注内皮祖细胞组(EPC组)骨髓中白细胞(A)、网织红细胞(B)、血小板计数的变化(C)(^a与BMT组比较, $P<0.05; n=3$)



1: 阴性对照组; 2~5 分别为移植后第 7、14、21、28 天
 图 4 单纯骨髓移植组 (BMT 组) 和联合输注内皮祖细胞组 (EPC 组) CD68 蛋白表达比较 (n=3)

天接近 BMT 组, 两组差异无统计学意义; 第 14、21、28 天, EPC 组与 BMT 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5C)。P20 为 caspase-1 活化后产生的蛋白, 其表达水平反映了 caspase-1 活化程度, Western blot 结果显示, BMT 组在第 14 天时活化最明显, 高于 BMT 其他各时间点水平; 而 EPC 组活化水平变化不大 (图 6C)。

讨 论

HSCT 是临床治疗恶性血液病的重要策略, 然而, 治疗中的并发症制约了该策略的疗效, 骨髓微环境损伤所致的造血延迟是重要原因。移植前的放化疗虽然为干细胞的归巢提供空间, 但是也同时造成骨髓微环境的一系列损伤。其中内皮细胞损

伤严重, 严重影响造血干细胞归巢和分化。EPC 作为内皮细胞的前体细胞具有干细胞特性, 能分化为成熟的血管内皮细胞, 不仅参与胚胎期血管生成, 还可诱导出出生后血管的生成, EPC 持续存在于骨髓和外周血, 在一定因素的影响下, 如局部的血管损伤、缺血、创伤、烧伤、细胞因子及某些药物等刺激, 骨髓中的 EPC 可被动员、聚集在活跃的血管新生部位, 参与新血管形成^[12-13]。在血管形成过程中, 其不仅能分化为内皮细胞, 直接参与血管的发生, 还可产生促血管生成的细胞因子促进血管重塑^[18]。然而, EPC 如何促进骨髓微环境修复、促进造血重建? 目前尚未见报道。为此, 本研究拟在前期研究基础上, 进一步探索 HSCT 的同时联合输注 EPC 后对骨髓微环境中炎性损伤的影响。结果显示骨髓嵌合率第 7 天明显提高; 第 14 天时骨髓修复情况明显好转, 外周血常规指标在第 10、15、20、25 天也提高。以上研究结果与我们前期结果是吻合的^[9,11], 提示, HSCT 联合 EPC 输注可以促进移植后骨髓造血。

同时, 我们在研究中还发现, 输注 EPC 组小鼠第 14 天的骨髓腔中, 坏死细胞数及空洞明显减少, 骨髓细胞炎性细胞浸润在第 7、14、21、28 天均较 BMT 组少, 且炎性复合体 nlrp1、nlrp6 和 P20 的活化程度亦显著降低, 由此可见, 联合 EPC 输注可减轻骨髓中炎性细胞浸润, 减轻了炎性复合体的活化。Masters 等^[19]发现 nlrp1 在患者化疗或感染期间会诱导造血细胞自身发生凋亡, 导致贫血及白细胞减少。他们分别对致死剂量照射后 nlrp1 缺陷小鼠和正常小鼠进行移植, 发现 nlrp1 缺陷小鼠造血祖细胞数量增加及血细胞数量恢复速度均较正常小鼠快。可见, 对炎性复合体活化进行抑制, 短期内对造血重建可能有促进作用。骨髓微环境是造血细胞赖以生存和分化的场所, 因此我们推测是否可以通过减轻骨髓中炎性复合体的浸润, 来促进骨髓造

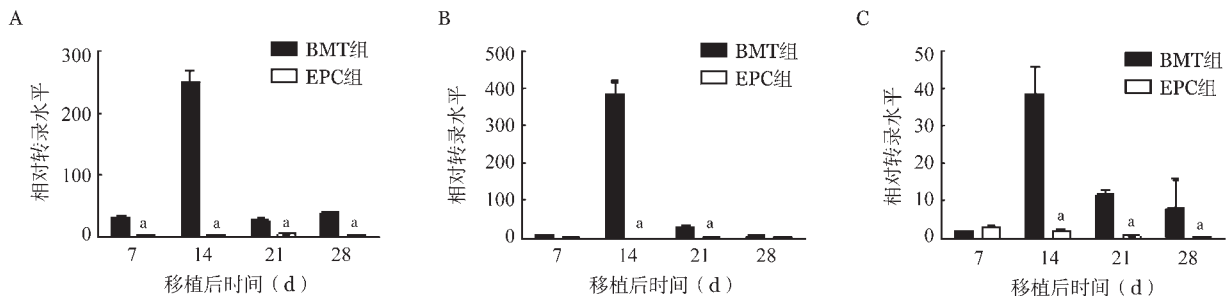
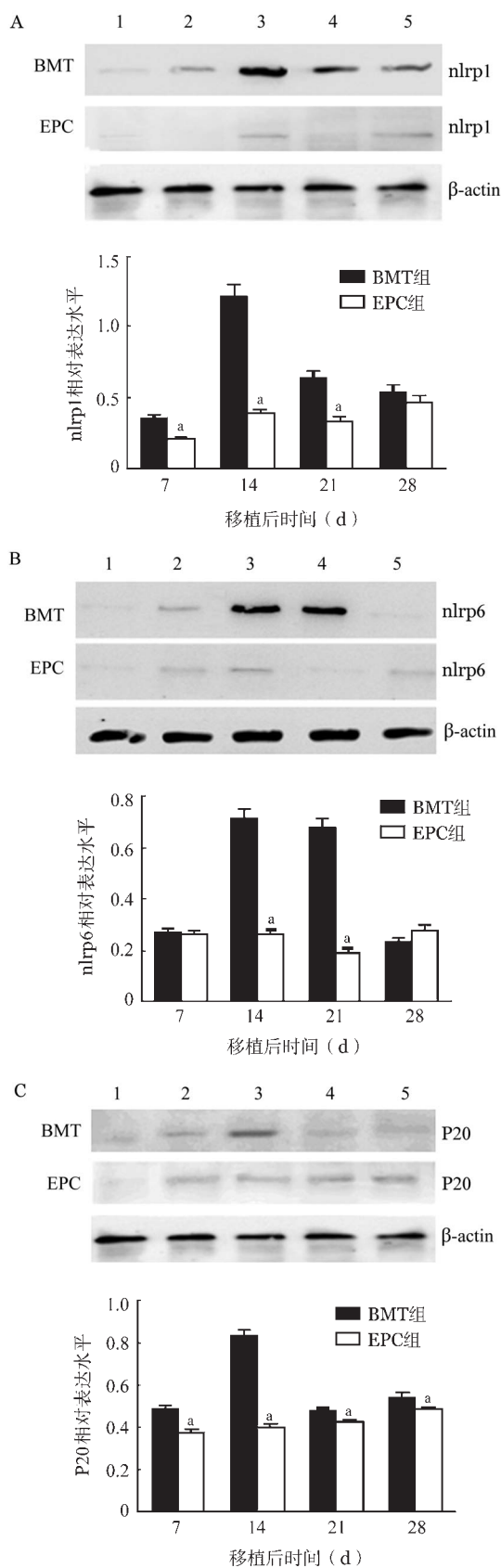


图 5 实时定量 RT-PCR 检测移植后不同时间单纯骨髓移植组 (BMT 组) 和联合输注内皮祖细胞组 (EPC 组) nlrp1 (A)、nlrp6 (B)、caspase-1 (C) 的转录水平 (* 与 BMT 组比较, $P < 0.05$; n=3)



1: 阴性对照组; 2~5: 分别为移植后第7、14、21、28天

图6 Western blot法检测移植后不同时间单纯骨髓移植组(BMT组)和联合输注内皮祖细胞组(EPC组) nlrp1(A)、nlrp6(B)、P20(C)表达水平(*与BMT组比较, $P < 0.05$; $n = 3$)

血重建。

HSCT后骨髓造血重建的好坏直接关系着移植的成败。炎性复合体在机体的造血重建中发挥着重要作用,然而炎性复合体在移植后骨髓修复中发挥的具体作用还有待进一步探索,了解炎性复合体在骨髓微环境中的具体作用会对今后的骨髓移植患者的治疗与并发症的控制具有重要的指导作用。

参考文献

- [1] 张毅, 张学光, 王江方, 等. 小鼠c-kit⁺Sca-1⁺和c-kit⁺Sca-1⁻细胞代表不同分化阶段的造血干/祖细胞[J]. 中华血液学杂志, 1996, 17(5):240-243.
- [2] Zhang Y, Adachi Y, Suzuki Y, et al. Simultaneous injection of bone marrow cells and stromal cells into bone marrow accelerates hematopoiesis in vivo[J]. Stem Cells, 2004, 22(7):1256-1262. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0173.
- [3] Li XM, Hu Z, Jorgenson ML, et al. Bone marrow sinusoidal endothelial cells undergo nonapoptotic cell death and are replaced by proliferating sinusoidal cells in situ to maintain the vascular niche following lethal irradiation [J]. Exp Hematol, 2008, 36(9):1143-1156. DOI: 10.1016/j.exphem.2008.06.009.
- [4] Slayton WB, Li XM, Butler J, et al. The role of the donor in the repair of the marrow vascular niche following hematopoietic stem cell transplant [J]. Stem Cells, 2007, 25(11):2945-2955. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0158.
- [5] 王金福, 邱丽燕, Harrington J, 等. 体外扩增小鼠造血干/祖细胞及重建造血功能的研究[J]. 中华血液学杂志, 2003, 24(11):584-588. DOI: 10.3760/j.issn:0253-2727.2003.11.007.
- [6] Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells [J]. Trends Immunol, 2011, 32(7):315-320. DOI: 10.1016/j.it.2011.03.009.
- [7] Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size [J]. Nature, 2003, 425(6960):836-841. DOI: 10.1038/nature02041.
- [8] Zeng L, Yan Z, Wang L, et al. Irradiation is an early determinant of endothelial injury during hematopoietic stem cell transplantation [J]. Transplant Proc, 2008, 40(8):2661-2664. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.08.062.
- [9] Zeng L, Yan Z, Ding S, et al. Endothelial injury, an intriguing effect of methotrexate and cyclophosphamide during hematopoietic stem cell transplantation in mice [J]. Transplant Proc, 2008, 40(8):2670-2673. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.06.038.
- [10] Salter AB, Meadows SK, Muramoto GG, et al. Endothelial progenitor cell infusion induces hematopoietic stem cell reconstitution in vivo [J]. Blood, 2009, 113(9):2104-2107. DOI: 10.1182/blood-2008-06-162941.
- [11] Yan Z, Zeng L, Li Z, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells promote hematopoietic reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation [J]. Transplant Proc, 2013, 45

- (1):427-433. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.03.064.
- [12] Newman ZL, Printz MP, Liu S, et al. Susceptibility to anthrax lethal toxin- induced rat death is controlled by a single chromosome 10 locus that includes rNlrp1 [J]. PLoS Pathog, 2010, 6(5):e1000906. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000906.
- [13] Mäkelä SM, Osterlund P, Julkunen I. TLR ligands induce synergistic interferon- β and interferon- λ 1 gene expression in human monocyte-derived dendritic cells[J]. Mol Immunol, 2011, 48(4): 505-515. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.10.005.
- [14] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation [J]. Nature, 2008, 454 (7203):428- 435. DOI: 10.1038/nature07201.
- [15] Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition[J]. Cell, 1997, 91(3):295-298.
- [16] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family [J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12:991-1045. DOI: 10.1146/annurev. iy.12.040194.005015.
- [17] McIntire CR, Yeretsian G, Saleh M. Inflammasomes in infection and inflammation [J]. Apoptosis, 2009, 14 (4):522- 535. DOI: 10.1007/s10495-009-0312-3.
- [18] Sanz C, Calasanz MJ, Andreu E, et al. NALP1 is a transcriptional target for cAMP-response-element-binding protein (CREB) in myeloid leukaemia cells[J]. Biochem J, 2004, 384(Pt 2):281- 286. DOI: 10.1042/BJ20040867.
- [19] Masters SL, Gerlic M, Metcalf D, et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells [J]. Immunity, 2012, 37 (6):1009-1023. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.08.027.

(收稿日期:2016-09-16)

(本文编辑:王叶青)

·读者·作者·编者·

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计学符号:按GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。例如:调查设计分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究;实验设计应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等;临床试验设计应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等。主要做法应围绕重复、随机、对照、均衡4个基本原则概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述:用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表达近似服从正态分布的定量资料,用中位数(四分位数间距)[$M(Q_R)$]表达呈偏态分布的定量资料。用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚。用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则。用相对数时,分母不宜小于20,要注意区分百分率与百分比。

4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析。对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对各因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$)时,应表述为对比组之间的差异有统计学意义,而不应表述为对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如 $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P > 0.05, P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表达方式,无须再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,应再给出95%可信区间。

6. 样本数(病例数)小于20例的临床研究,原则上不进行统计学分析。

本刊编辑部